



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO95/30772 (43) 国際公開日 1995年11月16日(16.11.95)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平6/94398 1994年5月6日(06.05.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 鎌滝哲也(KAMATAKI, Tetsuya)(JP/JP) 〒064 北海道札幌市中央区南8条西23丁目1番33号 南8条住宅401-14号 Hokkaido, (JP) (74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, KR, MX, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : METHOD OF DETECTING HUMAN CYTOCHROME P4502D6 GENE POLYMORPHISM (54) 発明の名称 ヒトチトクロームP4502D6遺伝子多型の検出方法 <div data-bbox="446 1438 1031 1900" data-label="Diagram"> </div>		
(57) Abstract A method of detecting human cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene polymorphism characterized by detecting the presence of an insertion of a repetitive 9-base sequence of TCACCCGTG in the exon 9 of the CYP2D6 gene. This method permits detection of a new polymorphism of CYP2D6 genes which has not been reported heretofore.		

本発明は、ヒトチトクローム P 4 5 0 2 D 6 (C Y P 2 D 6) 遺伝子のエクソン 9 において、T C A C C C G T G の 9 塩基の繰返し配列によるインサージョンの存在を検出することを特徴とするヒトチトクローム P 4 5 0 2 D 6 遺伝子多型の検出方法を提供するものである。

本発明方法によれば、従来報告のない新しい C Y P 2 D 6 の多型を検出することができる。

情報としての用途のみ

P C T に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に P C T 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	イグルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KR	大韓民国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	US	米国
CN	中国			PL	ポーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国			PT	ポルトガル	VN	ベトナム
DE	ドイツ						

明 細 書

ヒトチトクローム P 4 5 0 2 D 6

遺伝子多型の検出方法

技 術 分 野

- 5 本発明は薬物代謝関連酵素の遺伝子診断法、殊にチトクローム P 4 5 0 2 D 6（以下、C Y P 2 D 6 と略す）の遺伝子多型の新規な検出方法に関する。

従 来 技 術

- ヒトチトクローム P 4 5 0（P 4 5 0）は、薬物や生
10 体外異物の解毒化及び代謝的活性化、ステロイドホルモンや胆汁酸の生合成等の重要な働きを担う酵素である。
C Y P 2 D 6 は、該 P 4 5 0 の 1 分子種であり、殊に臨床治療上重要な多くの薬物の代謝に関与しており、現在
までに、抗高血圧薬であるブデリソキンやプロパフェノ
15 ン、 β -遮断薬であるプロプラノロール、三環系抗うつ薬であるイミプラミン等の 2 6 種類もの薬物が、該 C Y
P 2 D 6 の特異的基質となることが報告されている

[Eichelbaum, M. and Gross, A. S., Clin. Pharmac. Ther.,
46, 377-394 (1990)]。

- 20 一方、上記 C Y P 2 D 6 には多型性が存在することが明らかにされており、常用量の服用でも代謝能の低いひと（poor metabolizer: 以下 P M と略す）では、高い血

- 中濃度を維持することにより、薬の効き過ぎ（副作用）が生じることが報告されている。上記 C Y P 2 D 6 における多型性には人種差が存在し、P M の頻度は欧米人では 5 ～ 1 0 % である〔Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R. C., Meyer, U. A. and Gonzalez, F. J., Am. J. Hum. Genet., 45, 889-904 (1989)〕のに対して、日本人では 0 ～ 2 % と非常に少ない〔Yokota, T., Tamura, S., Furuya, H., Kimura, S., Watanabe, M., Kanazawa, I., Kondo, I. and Gonzalez, F. J., Pharmacogenetics, 3, 256-263 (1993)〕。
- 10 従って、許可前の新薬が C Y P 2 D 6 の特異的基質であった場合は、臨床試験においてはその低い P M 頻度のために副作用の発現を確認できずに、上市後に重篤な副作用の生じる可能性が十分に考えられ、この点より日本人において特に注意を払う必要がある〔鎌滝哲也, T D M
- 15 研究., 10, 2-7 (1993)〕。

最近、上記 C Y P 2 D 6 における多型の原因はその遺伝子における変異にあることが欧米人の C Y P 2 D 6 の遺伝子解析により明らかにされた〔Gonzalez, F. J. and Meyer, U. A., Clin. Pharmac. Ther., 50, 233-238 (1991);

20 Heim, M. and Meyer, U. A., Lancet, 336, 529-532 (1990); Smith, C. A. D., Gough, A. C., Leigh, P. N., Summers, B. A., Harding, A. E., Maranganore, D. M., Sturman, S. G.,

Schapira, A. H. V., Williams, A. C., Spurr, N. K. and
wolf, C. R., Lancet, 339, 1373-1377 (1992)〕。即ち、
CYP2D6は9つのエクソンから構成されるが、ゲノ
ムDNAで2637番目のエクソン5における1塩基置
5 換であるA型変異、同1934番目のエクソン4におけ
るエクソン-イントロン接合部位の1塩基置換であるB
型変異及び全欠損であるD型変異が報告され、これらの
変異・欠損により代謝能が著しく損なわれることが明ら
かにされている。

- 10 上記A型変異及びB型変異はCYP2D6の変異で非
常に高い割合を占めていると考えられ、欧米人のPMの
95%はこの両者の変異によって説明できるとの報告
〔Daly, A. K., Armstrong, M., Monkman, S. C., Idle, M. E.
and Idle, J. K., Pharmacogenetics, 1, 33-41 (1991)〕
15 や、欧米人のPMの75%はB型変異に、5～11%は
A型変異に属するとの報告〔上記Gonzalez, F. J. 等〕が
ある。

しかしながら、日本人においてはこれらの変異の頻度
が低いために殆ど研究は進められていない現状にある。

20 発 明 の 開 示

本発明は、CYP2D6遺伝子の新規な変異を明らかに
にするものであり、かかるCYP2D6遺伝子多型を検

出する新しい方法を提供することを目的とする。特に本発明は、少量のDNA試料を利用して、CYP2D6遺伝子の新しい多型を検出できる簡便、容易でしかも感度及び精度の高い上記検出方法を開発することを目的とする。

本発明者は上記目的より、日本人のPMのCYP2D6遺伝子の解析及び家系解析を行なった結果、上記目的に合致する新しい遺伝子多型を見出すと共に、その検出技術を開発するに成功し、ここに本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、CYP2D6遺伝子のエクソン9において、TCA C C C G T Gの9塩基の繰返し配列によるインサージョンの存在を検出することを特徴とする、CYP2D6遺伝子多型の検出方法に係わる。

本明細書において、アミノ酸配列及び塩基配列の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定乃至当該分野における通称又は慣用に従うものとし、塩基番号はCYP2D6ゲノムDNA〔上記Yokota, T. 等の文献の表記〕に従って表記する。

本発明によって明らかにされた新しい型の変異は、CYP2D6遺伝子のエクソン9である4213番目において、TCA C C C G T Gの9塩基の繰返し配列によ

るインサージョンの存在として特徴付けられる。

本発明方法は、かかる特定の変異を検出する限りにおいてその手法等に何等の限定もなく、例えば常法である各種の方法を広く採用することができる。本発明によつて検出すべき遺伝子変異が明らかにされこれが特定されている以上、その検出のための手法の適宜採用は、本出願開示に従えば当業者に容易であろう。例えば本発明方法は、上記特定された位置の塩基配列の解析を行なうことによっても可能であり勿論これを包含する。サザンハイブリダイゼーション法やドットハイブリダイゼーション法〔何れも Southern E. M., J. Mol. Biol., 98, 503-517 (1975)〕も採用し得る選択であろう。例えば、PCR (Polymerase chain reaction) - RFLP 法 (Restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断片長多型分析法)、PCR - 単鎖高次構造多型分析法〔Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 86, 2766-2770 (1989)〕、PCR - SSO 法〔Specific sequence oligonucleotide; PCR - 特異的配列オリゴヌクレオチド法〕、PCR - SSO とドットハイブリダイゼーション法を用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法 (Allele specific oligomer: ASO; Saiki, R. K.,

Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., Nature, 324, 163-166 (1986)] 等に従うことができる。

特に本発明においては、上記 R F L P 法の採用を好ま
5 しく例示することができ、殊に P C R 法を利用する D N A の増幅手法との組合わせによれば、少量の D N A 試料を利用して簡便且つ容易にしかも感度及び精度の高い検出が可能である。以下、この検出法 (P C R - R F L P 法) を例にとり本発明を詳述する。

- 10 尚、本発明の検出法において採用され得る各種の操作、例えば一部 D N A の化学合成、D N A の切断、削除、付加乃至結合を目的とする酵素処理、D N A の単離、精製、複製、選択等はいずれも常法に従うことができる〔分子遺伝学実験法、共立出版株式会社、1983年発行；
- 15 P C R テクノロジー、宝酒造株式会社、1990年発行等〕。例えば、D N A の単離精製は、アガロースゲル電気泳動法等に従い得、D N A 配列の決定は、例えばジデオキシ法 [Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 74, 5463-5467 (1977)]
- 20 やマキシサムーギルバート法 [Maxam, A. M. and Gilbert, W., Method in Enzymology, 65, 499-560 (1980)] 等に従い得る。上記 D N A 塩基配列の決定は、市販のシーク

エンスキット等を用いることによっても容易に行ない得る。DNAの特定領域の増幅のためのPCR法もまた常法〔例えば、Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N., Science, 230, 1350-1354 (1985)〕に従うことができる。

5 これら各種の基本的操作は、例えば本出願に引用の各種文献においても採用されており、後述の実施例とともに参照される。

本発明の検出法において、測定対象であるゲノムDNAは、ヒト由来のサンプルでありこれを含むものであれば特に限定なく採用でき、例えば血液、骨髄液、精液、腹腔液等の体液、肝臓等の組織細胞、毛髪等の体毛等を例示できる。ゲノムDNAはこれらのサンプルより常法に従い抽出、精製し、調製することができる。該ゲノムDNAより、本発明にかかる変異部位を含むDNA領域を増幅し、多量にかつ濃縮された被検体を得ることができる。これは、例えばPCR法に従い実施でき、上記エクソン9のインサージョン部分を含み、かつCYP2D6遺伝子のみを特異的に増幅するように適宜設定したプライマーを採用することにより行なわれる。かかる

10

15

20

プライマーの設定は、常法に従えばよく、増幅する領域の塩基長等にも制限はなく通常100bpから500

- b p 程度とすることができる。尚、増幅される D N A 領域は、引続く R F L P 法において好適に使用し得る任意の制限酵素サイトを含むように設定され、これは該 D N A 領域を該酵素により処理して得られる切断断片に、
- 5 変異遺伝子と通常 (wild: 野生型) 遺伝子の場合で検出を可能とする長さの違いをもたらす限りにおいてどのようにも設定することができる。かかるプライマー設定の好適な 1 例は、後述の実施例に示す、センスプライマー (9 - S) 及びアンチセンスプライマー (9 - A S) で
- 10 あり、かかる設定によれば、C Y P 2 D 6 について塩基配列の相同性が非常に高い 2 つのシュードジーン、即ち C Y P 2 D 7 及び C Y P 2 D 8、と区別して C Y P 2 D 6 の上記所望領域のみを特異的に増幅することが可能である。かかるプライマーの設定によれば、所望の制限
- 15 酵素サイト (S t y I サイト) を 1 ケ所含み、この酵素処理により 7 7 b p (野生型) 又は 8 6 b p (変異型) と 2 5 7 b p (共通) の切断断片を与える、3 3 4 b p (野生型) 及び 3 4 3 b p (変異型) の所望 D N A 領域が増幅される。
- 20 かくして P C R 法に従い増幅された所望 D N A 領域は、R F L P の検出に従うサザンブロット法或いはゲル電気泳動法等の採用により、容易に、その領域に含まれる変

異を検出確認することができる。該所望DNA領域は、上記において適宜に選択された制限酵素による処理（消化）に供され、生成した切断断片は常法に従い特定バンドとして確認される。

- 5 上記のようにして得られたバンドのパターンより、CYP2D6遺伝子多型（本発明にかかる変異の存在）を検出することができる。

図面の簡単な説明

図1は、参考例2（1）において設定したプライマー
10 の塩基配列と存在位置を示す。

図2は、実施例1（1）において設定したプライマーの塩基配列と存在位置を示す。

図3は、実施例1に示す方法に従って得られたPM及びEMについての電気泳動写真とその結果観察される9
15 塩基インサージョンの塩基を示す。

図4は、実施例2（1）において設定したプライマーの塩基配列と存在位置を示す。

図5は、実施例2（3）に示すCYP2D6遺伝子エクソン9のインサージョンのバンド長による判定を示す。

20 図6は、図5に示す判定に従う型の区別を示す模式図である。

図7は、実施例2に従い得られたPM及びその両親の

判定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げるが、本発明はこれに限定されない。

- 5 尚、各例に用いた試薬等に関する略号は、それぞれ次のものを示す。これらの組成は1リットル当りの濃度又は量であり、必要のあるものはオートクレーブ（121℃、20分）等の滅菌処理を行なった。
- TE溶液…10mMトリスHCl（pH7.5）、
10 1mMエチレンジアミン4酢酸ジナトリウム
 （EDTA）（pH8.0）
 - 20×SSC…3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム
 - 5×デンハルト（Denhardt's）溶液…フィコール10
15 g、ポリビニルピロリドン10g、牛血清アルブミン
 （BSA）10g
 - 2×ハイブリダイゼーション緩衝液（pH8.0）…
 0.1MトリスHCl（pH8.0）、2M塩化ナトリウム、
 20mMEDTA、0.2%ドデシルサル
20 フェートナトリウム（SDS）
 - SE溶液…10mMトリスHCl（pH7.4）、
 50mMEDTA、0.5%N-ラウロイルサルコ

シン 2 ナトリウム

- ・ホルムアミド色素…ホルムアミド 1 0 0 m l、キシレンシアノール F F 0. 1 g、プロモフェノールブルー 0. 1 g、0. 5 M E D T A 4 m l
- 5 ・S T E…1 0 0 m M 塩化ナトリウム、1 0 m M トリス H C l (p H 7. 5)、1 m M E D T A (p H 8. 0)
- ・L B 培地…グルコース 1 g、塩化ナトリウム 5 g、酵母エキス 5 g、バクトトリプトン 1 0 g
- 10 ・L B A m p ⁺ 培地…グルコース 1 g、塩化ナトリウム 5 g、酵母エキス 5 g、バクトトリプトン 1 0 g、アンピシリン (オートクレーブ後、終濃度 2 5 μ g / m l となるように添加)
- ・L B A m p ⁺ プレート…上記 L B A m p ⁺ 培地に寒天末 1 1 g を添加
- 15 ・2 × T Y 培地…バクトトリプトン 1 6 g、酵母エキス 1 0 g、塩化ナトリウム 5 g
- ・2 × T Y プレート…上記 2 × T Y 培地に寒天末 1 1 g を添加
- 20 ・1 0 × P C R 緩衝液 (p H 8. 3) …1 0 0 m M トリス H C l (p H 8. 3)、5 0 0 m M 塩化カリウム、0. 0 1 % (w / v) ゼラチン、塩化マグネシウム

1 2

(単位を mM とし、濃度はその度に示した)

- H 寒天培地…バクトトリプトン 20 g、塩化ナトリウム 8 g、寒天末 12 g
- H 上層寒天…バクトトリプトン 20 g、塩化ナトリウム 8 g、寒天末 8 g
- 10×T4 DNA ポリメラーゼ緩衝液 (pH 8.8)
…667 mM トリス HCl (pH 8.8)、67 mM 塩化マグネシウム、116 mM 硫酸アンモニウム、100 mM 2-メルカプトエタノール、67 μM EDTA、0.167% BSA
- 10×デナチュレーション (Denaturation) 緩衝液 (pH 9.5) …20 mM トリス HCl (pH 9.5)、1 mM スペルミジン、0.1 mM EDTA
- 10×ブラントエンド (Blunt end) 緩衝液…0.5 M トリス HCl (pH 9.5)、0.1 M 塩化マグネシウム、0.1 M 2-メルカプトエタノール
- ラベリングミックス (Labeling mix) …7.5 μM デオキシグアノシン 5'-トリフォスフェート (dGTP)、7.5 μM デオキシシチジン 5'-トリフォスフェート (dCTP)、7.5 μM デオキシチミジン 5'-トリフォスフェート (dTTP)
- 40% アクリルアミド保存液…アクリルアミド 38 g、

1 3

ビスアクリルアミド 2 g、精製水で計 100 ml とする

・ 10 × T B E (p H 8. 3) … トリス 108 g、ホウ酸 55 g、E D T A 9. 3 g

5 ・ ゲル A … 尿素 76. 8 g、40% アクリルアミド保存液 24 ml、10 × T B E 8 ml、精製水で計 160 ml とする

・ ゲル B … 尿素 14. 4 g、40% アクリルアミド保存液 4. 5 ml、10 × T B E 7. 5 ml、ショ糖

10 3. 0 g、プロモフェノールブルー色素溶液 (10 mg / ml)、精製水で計 30 ml とする

・ 10 × H 溶液 … 500 mM トリス H C l (p H 7. 5)、100 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール (D T T)、100 mM 塩化ナトリウム

15 ウム

・ 10 × M 溶液 … 100 mM トリス H C l (p H 7. 5)、100 mM 塩化マグネシウム、10 mM D T T、500 mM 塩化ナトリウム

参考例 1

20 (1) ヒト末梢血ゲノム D N A の調製

ヒトの末梢血よりゲノム D N A を以下の方法に従って調製した。即ち、抗凝固剤ヘパリンを使用して採血した

- ヒト末梢血 10 ml を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、バッフィーコートを得た。得られたバッフィーコートに等量の冷 PBS を加え、同様に遠心分離操作を 2 ～ 3 回繰返した。得られたバッフィーコートを 5 倍量の
- 5 0.2% 塩化ナトリウム - 5 mM EDTA 溶液で洗浄し、5000 rpm、10 分間遠心分離し、沈殿を回収した。沈殿のヘモグロビン色が消えるまで上記洗浄操作を繰返し、得られた沈殿に TE 溶液 0.5 ml を加えて完全に懸濁させた後、リボヌクレアーゼ A (RNase
- 10 A、10 mg/ml) 及びアクチナーゼ E (20 mg/ml) をそれぞれ 2 μ l 及び 100 μ l ずつ加えた。これを再度懸濁させた後、SE 溶液 1.5 ml を加え、37℃で2時間インキュベート後、TE 溶液 1 ml で希釈した。
- 15 次にフェノール-クロロホルム溶液による抽出操作を蛋白層が消失するまで繰返し、最後にクロロホルム抽出を行ない、抽出物を 1/20 量の 5 M 塩化ナトリウム、3 倍量の冷エタノールで沈殿させ、得られた DNA を 70% エタノールで洗浄し、得られたゲノム DNA を
- 20 TE 溶液に溶解し 260 nm における吸光度を測定 (分光光度計: 島津 UV-160 使用) して定量した。
- (2) CYP2D6 cDNA を用いたサザンブロット分

析

上記(1)で調製したゲノムDNA 8 μ gを、制限酵素EcoRI又はXbaIで消化し、0.8%アガロースゲルでパルスフィールド(東洋社製エレボスPS-1510使用、100V、フォワード2秒、バック0.6秒)を用いて電気泳動後、0.5N水酸化ナトリウム溶液-1M塩化ナトリウム溶液、1MトリスHCl(pH7.4)-1M塩化ナトリウム溶液で変性し、中和を30分間ずつ行ない、20 \times SSCで30分間浸した後、キャピラリー法でナイロン膜(Schleicher & Shuell)にDNAを8~12時間かけてトランスファーさせた。3 \times SSCで膜を洗浄した後、80 $^{\circ}$ Cで2時間ベイクすることによりDNAをナイロン膜に固着させた。

100 μ g/mgの熱変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション緩衝液(pH8.0)(1 \times ハイブリダイゼーション緩衝液と1 \times デンハルト溶液を含む)中で、65 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートしてナイロン膜をブロッキングした後、100 μ g/mgの熱変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション緩衝液(pH8.0)に $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dCTP(アマシャム社)を用いてラベル後、熱変性したプローブ(全長1.5 kbのCYP2D6 cDNA) 50 ngを加え、65 $^{\circ}$ C

で8～12時間、ハイブリダイゼーションを行なった。
ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を2×SSC-
0.1%SDSで室温15分間1回、0.5×SSC-
0.1%SDSで50℃15分間1回それぞれ洗浄し、
5 風乾後、-80℃で12～16時間オートラジオグラフ
ィーを行なった。

(3) 解析結果と考察

抗高血圧薬であるラブリソキンを用いたヒトにおける
代謝試験により Log_{10} 代謝率〔Metabolic ratio
10 (MR) = 未変化体/水酸化体代謝物 : Log_{10} MR >
1.1をPMと定義する〕が1.50を示したPMとそ
の両親及びEM (Extensive metabolizer: 以下EMと略
す) から、それぞれ末梢血を採取し、上記(1)に従い
ゲノムDNAを調製した。

15 調製された各ゲノムDNAにつき、上記(2)に従っ
て制限酵素EcoRI又はXbaIで処理し、サザンブ
ロット分析を行なった。

その結果、CYP2D6についてEcoRI処理した
PMとその両親の試料の分析では、16.0、9.4及
20 び8.6 kbに共通してバンドが確認された。

しかして、CYP2D6について塩基配列の相同性が
非常に高い2つのシュードジーンCYP2D7及び

CYP2D8が報告されており、CYP2D6及びこれらのそれぞれのEcoRI処理後のサザンブロット分析によれば、それぞれ9.4、16.0及び8.6 kbにバンドを与えることが知られている〔前記Kimura, S. 等
5 参照〕。

また、XbaI処理後の上記各試料分析でも、3人に共通して29.0、4.8 kbにそれぞれバンドが認められ、PMとその父親の試料では更に11.5 kbにバンドが認められた。

- 10 上記XbaI処理後のサザンブロット分析については、従来より多数の検討がなされており、44.0、29.0、11.5、16.0 + 9.0 kbのバンドにおいて遺伝子多型が示されている。これらの報告によれば、3つのCYP2D遺伝子が5'側よりCYP2D8、
15 CYP2D7、CYP2D6と位置すると29.0 kbに、同3つの遺伝子に更にもう1つのCYP2D7が加わり5'側よりCYP2D8、CYP2D7、CYP2D7、CYP2D6と位置すると44.0 kbにそれぞれバンドが検出される。また、11.5 kbのバンドは
20 CYP2D6の完全欠損（D型変異）であることを示し〔Johansson, I., Yue, Q. Y., Dahl, M. L., Heim, M., Bertilsson, L., Meyer, U. A., Sjoqvist, F., and

Ingelman-Sundberg, M., Eur. J. Clin. Pharmacol., 40, 553-556 (1991))、16.0、9.0 kbのバンドが同時に認められるとCYP2D7、CYP2D6の間のゲノムDNAの変異であることが報告されている。

- 5 これらのことから、PMは対立遺伝子の一方がCYP2D6の完全欠損であるD型変異であり、それは父親から遺伝したものと考えられた。

参考例 2

PCR分析によるCYP2D6遺伝子の変異の検索

10 (1) プライマーの設定

CYP2D6遺伝子のA型変異とB型変異の検出のために、CYP2D6遺伝子のこれら変異部位のみを特異的に増幅するようにプライマーを設計し、またA型変異の判定用として3'末端を変異部位に設定し、1塩基の
15 差異で選択性を持たせた2種類のプライマー(A'-SW及びA'-SM)を設定した。

これら各プライマーの塩基配列とその存在位置を図1に示す。

(2) プライマーの精製

- 20 上記(1)で設計又は設定された各プライマーの調製、精製を次の通り行なった。即ち、29%アンモニア水3 mlで脱トリチル化して合成したオリゴヌクレオチドを、

29%アンモニア水3mlでレンジから切り離した後、60℃で4時間インキュベートした。アンモニア水を蒸発させた後、得られたペレットを20μlのホルムアミド色素に溶解させ、この溶液を100℃で5分間加熱後、
5 20%変性アクリルアミドゲルで電気泳動を行なった。尚、電気泳動用緩衝液には1×TBEを使用した。

上記泳動後、オリゴヌクレオチドを含むゲル部分の位置をUVランプ照射により確認後切り出し、1mlのシリンジを用いて押出し粉碎した。ここにSTE 5mlを加え、ローテーターでゆっくりと回転させ10～12時間抽出した。抽出液を100℃で10分間加熱した後、3000rpmで10分間遠心分離した。上清を、予めTE溶液で平衡化したDEAEセファデックスA-50カラムに通し、オリゴヌクレオチドを吸着させ、1.5M塩化ナトリウム-10mMトリスHCl (pH 7.5) 15 150μl、0.1N水酸化ナトリウム-1mMEDTA 200μl、10mMトリスHCl (pH 7.5) 50μlを順にカラムに通して溶出させた。尚、オリゴヌクレオチド回収のためのチューブには予め1M
20 トリスHCl (pH 7.5)を50μl入れておき、溶出液をすばやく中和した。この溶液をエタノール沈殿させ、得られたオリゴヌクレオチドを適量の精製水に溶解

20

させ、260nmの吸光度を計ることにより定量した。

(3) PCR法によりCYP2D6遺伝子のA型変異検出のためのゲノムDNAの増幅

PCR法を用いてCYP2D6遺伝子のA型変異（ゲノムDNAで2637番目のエクソン5における1塩基欠損）の部分を含むゲノムDNAの増幅を、パーキンエルマーシータス（Perkin Elmer Cetus）社のDNAサーマルサイクラー（DNA Thermal Cycler）を用いて以下の通り行なった（図1参照）。

- 10 即ち、参考例1の(1)で調製したゲノムDNA溶液（50ng/μl）1μlに、精製水17.5μl、5mMデオキシリボヌクレオチド5'-トリフォスフェート（dNTP）溶液1μl、10×PCR溶液（10mM）2.5μl、10μMセンスプライマー（A-S）
15 1μl、10μMアンチセンスプライマー（A-AS）1μlを加えて5分間煮沸後、3分間氷冷した。これにTaq DNAポリメラーゼ（1U/μl）1μlを加えて全量を25μlとし、更にミネラルオイルを当量重層し、94℃1分、55℃2分、72℃2分を1サイクル
20 として、25サイクルの反応を行なった。

反応終了後、ミネラルオイルを除き、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を順次行ない、得ら

れたDNA断片をTE30 μ lに溶解させた。

増幅したDNA断片がCYP2D6であることの確認は、そのバンド長(757bp)と、これを制限酵素(AvaI、PvuII)処理して、AvaI処理では
5 350、204、203bpのバンドが、PvuII処理では464、295bpのバンドをそれぞれ観察することにより行なった。

尚、上記において、CYP2D7が増幅すれば、AvaI処理で400、350bpのバンドが、CYP
10 2D8が増幅すれば、PvuII処理で431、146、90、70、27bpのバンドが観察されるため、これらと上記CYP2D6とは明確に区別できる。

(4) CYP2D6遺伝子のA型変異の判定

3'末端の1塩基のみが異なるセンスプライマー2種類(A'-SW、A'-SM)と、上記(3)で用いた
15 アンチセンスプライマー(A-AS)とを組み合わせ用い、また上記(3)で調製した試料溶液を用いて、CYP2D6遺伝子A型変異の判定を以下の通り行なった。

20 即ち、(3)で調製した試料溶液1 μ lに、精製水17.5 μ l、5mM dNTP溶液1 μ l、10 \times PCR溶液(7.5mM)2.5 μ l、判定用の10M

センスプライマー (A' - SW又はA' - SM) 1 μ l、
10 Mアンチセンスプライマー (A - AS) 1 μ lを加
えて5分間煮沸後、3分間氷冷した。Taq DNAポリ
メラーゼ (1 U / μ l) 1 μ lを加えて全量を25 μ l
5 とし、更にミネラルオイルを当量重層し、94 $^{\circ}$ C 1分、
55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして25サイク
ルの反応を行なった。反応終了後、ミネラルオイルを除
き、0.02%エチデュームブロミド (EtBr) を含
む1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動後、判定を
10 行なった。

3'末端の1塩基のみが異なるセンスプライマーの内、
A' - SWは野生株のみを、A' - SMはA型変異のみ
をそれぞれ特異的に増幅させるものであるため、A' -
SW側にのみ451bpのバンドが観察されると野生型、
15 A' - SW、A' - SM側の両方に451bpのバンド
が観察されるとヘテロのA型変異、A' - SM側のみ
451bpのバンドが観察されるとホモのA型変異と、
それぞれ判定できる。

この結果、PMとその両親ともに野生型を示すA' -
20 SW側のみに451bpのバンドが認められ、A型変異
ではないことが確認された。

(5) PCR法によるCYP2D6遺伝子のB型変異検

23

出のためのゲノムDNAの増幅

センスプライマーとして (B-S) を、アンチセンス
プライマーとして (B-A S) をそれぞれ用いて、上記
(3) に準じて CYP2D6 遺伝子の B 型変異 (ゲノム
5 DNA で 1934 番目のエクソン4におけるエクソン-
イントロン接合部位の1塩基置換) の部分を含むゲノム
DNA の増幅を行なった。

増幅した DNA 断片が CYP2D6 であることの確認
は、そのバンド長 (533 bp) と、これを制限酵素
10 (Ava I) 処理して、311、146、76 bp のバ
ンドをそれぞれ観察することにより行なった。上記にお
いて、CYP2D7、CYP2D8 が増幅すれば、
Ava I 処理で 457、76 bp のバンドが観察される
ため、これらと上記 CYP2D6 とは明確に区別できる。

15 (6) CYP2D6 遺伝子の B 型変異の判定

CYP2D6 遺伝子の B 型変異は、エクソン4におけ
るエクソン-イントロン接合部位の1塩基置換の制限酵
素 Mva I の認識酵素の消失を利用して判定できる。

即ち、上記 (5) で調製した試料溶液 10 μ l に、
20 10 \times M 溶液 2 μ l、Mva I (10 U/ μ l) 2 μ l、
精製水 6 μ l を加えて全量を 20 μ l とし、37°C 2 時
間インキュベート後、2%アガロースゲルを用いて電気

泳動を行なった。

- 279bpのバンドが観察されると野生型、384、
279bpのバンドが観察されるとヘテロのB型変異、
384bpのバンドが観察されるとホモのB型変異と判
5 定できる。

この結果、PMとその両親ともに279bpのバンド
が認められ、B型変異ではないことが確認された。

実施例 1

PMにおけるCYP2D6遺伝子の塩基配列の解析

10 (1) プライマーの設定及び精製

CYP2D6遺伝子のすべてのエクソン、エクソニー
イントロン接合部位を4ヶ所に別けてそれぞれ特異的に
増幅するようにプライマーを設定し、参考例2と同様に
して各プライマーを精製し、これらを用いて以下の

- 15 PCR法にて各フラグメントを増幅させた。

設定したプライマーの塩基配列、CYP2D6の対応
位置及び得られる各フラグメントの概略を図2に示す。

尚、上記で利用するエクソン2～4の部位を増幅させる
ためのアンチセンスプライマー（B-A S）、エクソン

- 20 5～6の部位を増幅させるセンスプライマー（A-S）
及びアンチセンスプライマー（A-A S）は、それぞれ
参考例2で作成したものと同一のものを使用した。

(2) P C R 法による C Y P 2 D 6 遺伝子のエクソン及び
エクソン-イントロン接合部位の増幅

P C R 法を用いて C Y P 2 D 6 遺伝子のエクソン及び
エクソン-イントロン接合部位を含むゲノム D N A を次
5 の通り増幅させた。

即ち、参考例 1 で調製したゲノム D N A 溶液 (5 0
n g / μ l) 1 μ l に、精製水 1 7 . 5 μ l 、 5 m M
d N T P 溶液 1 μ l 、 1 0 \times P C R 溶液 (1 0 m M)
2 . 5 μ l 、 1 0 μ M センスプライマー 1 μ l 、 1 0
10 μ M アンチセンスプライマー 1 μ l を加えて 5 分間煮沸
後、 3 分間氷冷した。これに T a q D N A ポリメラーゼ
(1 U / μ l) 1 μ l を加えて全量を 2 5 μ l とし、更
にミネラルオイルを当量重層し、 9 4 $^{\circ}$ C 1 分、 F 1 では
5 3 $^{\circ}$ C、 F 2 では 4 8 $^{\circ}$ C、 F 3 では 5 5 $^{\circ}$ C、 F 4 では
15 5 0 $^{\circ}$ C でそれぞれ 2 分、 7 2 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとして、
2 5 サイクルの反応を行なった。反応終了後、ミネラル
オイルを除き、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エ
タノール沈殿を順次行ない、得られた各 D N A 断片を
T E 2 0 μ l に溶解させた。

20 増幅した各 D N A 断片が C Y P 2 D 6 由来のものである
ことは、バンド長と、適当な制限酵素 (F 1 :
H h a I 、 F 2 : A v a I 、 F 3 : A v a I 、 P v u I

I、F4 : Sty I) 処理によるバンドの観察により確認した。

(3) ブルースクリプトベクターへのサブクローニング
上記(2)で得たCYP2D6の各DNA断片(F1
5 ~ F4)の平滑末端化を次の通り実施した。

即ち、それぞれ500 ng相当をTE20 μ lに溶解し、2 mM dNTP 8 μ l、T4 DNAポリメラーゼ1 μ l、10 \times T4 DNAポリメラーゼ緩衝液(pH 8.8) 4 μ l、精製水7 μ lを加え全量40 μ lとし、
10 37 $^{\circ}$ C、15分間反応を行なった。精製水を加えて全量を200 μ lにした後、フェノール抽出2回、クロロホルム抽出1回を行ない、得られた上清に3 M酢酸ナトリウム(pH 5.6)溶液15 μ lと冷エタノール375 μ lを加え、-80 $^{\circ}$ Cに冷却後、12000 rpm、4
15 $^{\circ}$ Cで20分間遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄後乾燥した。

上記PCR産物の5'末端にはリン酸基がつかないため、リン酸化を次の通り実施した。即ち、平滑末端化したDNA断片にデナチュレーション緩衝液(pH 9.5)
20 75 μ lを加え、2分間煮沸後、氷中に2分間放置した。アデノシントリフォスフェート(ATP、50ピコモル/ μ l) 1 μ l、10 \times ブラントエンド緩衝液10 μ l、

精製水 $12\ \mu\text{l}$ 、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ ($11\ \text{U}/\mu\text{l}$) $2\ \mu\text{l}$ を加えて計 $100\ \mu\text{l}$ とし、 37°C 、
1 時間反応を行なった。精製水を加えて全量を $200\ \mu\text{l}$ にした後、フェノール抽出 2 回、クロロホルム抽出
5 1 回を行ない、得られた上清に $3\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム
($\text{pH}\ 5.6$) 溶液 $15\ \mu\text{l}$ と冷エタノール $375\ \mu\text{l}$
を加え、 -80°C に冷却後、 $12000\ \text{rpm}$ 、 4°C で
20 分間遠心分離し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し
た。沈殿を乾燥させた後、 $10\ \mu\text{l}$ の精製水に溶解させ
10 ることにより、挿入フラグメントをそれぞれ調製した。

ブルースクリプトベクター $2\ \mu\text{g}$ を HincII で処理後、 $1\ \text{M}$ トリス HCl ($\text{pH}\ 8.0$) $47\ \mu\text{l}$ 、アルカリホスファターゼ ($0.5\ \text{U}/\mu\text{l}$) $2\ \mu\text{l}$ を加え、全量を $52\ \mu\text{l}$ とした後、 65°C 、30 分間反応させた。
15 精製水を加えて全量を $200\ \mu\text{l}$ にした後、フェノール抽出を 3 回、クロロホルム抽出を 1 回行なった。この上清に、 $3\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム ($\text{pH}\ 5.6$) 溶液 $15\ \mu\text{l}$ と冷エタノール $375\ \mu\text{l}$ を加え、 -80°C に冷却後、 $12000\ \text{rpm}$ 、 4°C で 20 分間遠心分離し、沈殿を
20 70% エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させた後、 $20\ \mu\text{l}$ の TE に溶解し、ベクター側の脱リン酸化を行なった。

28

C Y P 2 D 6 のエクソン及びエクソン-イントロン接
合部位を含んだフラグメント 1 0 0 n g と、ブルースク
リプトベクター 1 0 n g とを混合し、ライゲーションを
行なった。連結反応終了後の D N A 溶液にコンピテント
5 セル懸濁液 3 0 0 μ l を加え、氷中に 2 0 分間放置した。
これに 4 2 $^{\circ}$ C、2 分間のヒートショックを与えた後、
1 m l の L B 溶液を加えて 1 時間インキュベートした。
3 0 0 0 r p m、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心分離し、上清 1 m l
を除き、再度懸濁させた後、L B 培地に播き、3 7 $^{\circ}$ C で
10 一晚培養して、形質転換体を得た。

尚、宿主大腸菌としては、T G 1 を用い、上記コンピ
テントセルは以下の方法により作製した。

大腸菌の一夜培養液 2 m l を 2 0 0 m l の L B 培地に
植え、6 5 0 n m における吸光度が 0 . 6 付近になるま
15 で 3 7 $^{\circ}$ C で培養した。これを氷水中で 3 0 分間冷却後、
集菌し、1 0 0 m l の 5 0 m M 塩化カルシウムに懸濁さ
せた。1 5 分間ゆっくり転倒攪拌しながら氷中に 1 時間
放置した後、再度集菌し。2 0 m l の 5 0 m M 塩化カル
シウム-2 0 % グリセロールに懸濁させた。これを、
20 3 1 0 μ l ずつ分注し、液体窒素でただちに凍結後、
- 8 0 $^{\circ}$ C で保存した。なお、集菌以降の操作はすべて低
温室 (4 $^{\circ}$ C) で行なった。

(4) 二本鎖DNAの少量調製

得られた形質転換体のコロニーを回収しLBAMP⁺培地3mlで培養した。この培養液を遠心分離して菌体を回収し、プラスミドDNAに少量調製を以下の方法に従って行なった。

即ち、先の培養液の1.5mlをチューブにうつし、5000rpm、5分間遠心分離後、沈殿の菌体を回収し、10mM EDTA溶液200 μ lに懸濁させた後、1%SDS-0.1M水酸化ナトリウム溶液400 μ lを加え、氷中に5分間放置した。5M酢酸カリウムの200 μ lを加えて5分間氷冷し、13000rpmで5分間遠心分離した。この上清を別のチューブに移し、イソプロパノール700 μ lを加えた。これを13000rpm、4℃で5分間遠心分離し、得られた沈殿を20mMトリスHCl (pH 7.5) / 10mM EDTA溶液100 μ lで懸濁させた後、RNase I (10mg/ml) 1 μ lを加えて65℃で15分間インキュベートした。フェノール抽出、クロロホルム抽出を行なった後、3M酢酸ナトリウム (pH 5.6) 12 μ lと冷エタノール2.24 μ lを加え、-80℃に冷却後、13000rpm、4℃で10分間遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄した。沈殿を乾燥させた後、

20 μ l の TE に溶解した。回収したプラスミドをベクターのマルチクローニングサイト及び組込んだ DNA 断片の制限酵素地図より選んだ制限酵素で処理後、アガロースゲル電気泳動することにより、それぞれ目的の

- 5 DNA 断片が挿入されていることを確認した。

(5) M13 ベクターへのサブクローニング

組込んだ DNA 断片のプラスミド内での方向性を、ベクターのマルチクローニングサイト及び及び組込んだ DNA 断片の制限酵素地図より選んだ制限酵素で処理を
10 行ない、確認した。

ベクターのマルチクローニング部位にのみに認識部位をもつ2種類の制限酵素 (EcoRI 及び BamHI) で処理して回収したフラグメントを、これらフラグメントと同様に処理した M13 ベクターに挿入し、ライゲーションを行なった。連結反応終了後の DNA 溶液
15

(100 ng) 30 μ l にコンピテントセル懸濁液 300 μ l を加え、40 分間水中に放置した。42℃、2 分間のヒートショック後、H 上層寒天 3 ml、大腸菌一夜培養液 200 μ l を混合し、H 寒天培地上に播き、
20 37℃で一晩培養して形質転換体を得た。尚、宿主大腸菌には JM103 を用いた。ここでコンピテントセルは、上記 (4) に示した方法に従い作製した。

(6) ファージ一本鎖DNAの調製

ファージ一本鎖DNAの調製を以下の方法で行なった。
即ち、形質転換体のプラークを回収し、 $2 \times \text{TY}$ 培地 3 ml 中で6時間培養した。この培養液 1.5 ml を
5 15000 rpm 、5分間、2回遠心分離して上清を回
収した。先の上清 1.3 ml に20%ポリエチレングリ
コール (PEG) - 2.5 M 塩化ナトリウム $200 \mu\text{l}$
を加え、室温で15分間放置した後、 15000 rpm 、
5分間遠心分離し、ファージDNAを沈殿させた。更に、
10 15000 rpm 、2分間遠心分離し、上清を完全に取り
除き、沈殿をTE $200 \mu\text{l}$ に溶解させ、フェノール
 $100 \mu\text{l}$ を加え攪拌後、室温で15分間放置した。更
にクロロホルム $100 \mu\text{l}$ を加えて同様の操作を行なっ
た。 10000 rpm 、5分間遠心分離し、上清 150
15 μl を取り、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.6) 溶液
 $15 \mu\text{l}$ と冷エタノール $375 \mu\text{l}$ を加え、 -80°C に
冷却後、エタノール沈殿を行なった。 12000 rpm 、
 4°C で20分間遠心分離を行ない、沈殿を70%エタノ
ールで洗浄した。沈殿を乾燥させた後、 $20 \mu\text{l}$ のTE
20 に溶解し、一本鎖DNAを回収した。アガロースゲル電
気泳動を行ない、フラグメントの入っていないM13ベ
クターより調製した一本鎖DNAを対照として、移動度

3 2

の小さいバンドが検出されることを利用して、目的の DNA 断片が挿入されていることを確認した。

(7) CYP2D6 遺伝子のエクソン及びエクソン-イントロン接合部位の塩基配列の解析

- 5 上記(6)で得られた一本鎖 DNA を用いて、塩基配列の解析を文献記載の方法 [Sanger, F., Miklen, S. and Coulson, A. R., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 74, 5463-5467 (1977)] に従い、以下の通り実施した。尚、シーケンス反応は、SequenaseTM VER. 2. 0 に添
- 10 付されているマニュアルに従って行なった。

- 即ちまず、鋳型 DNA 7 μ l (700 ng) とプライマー (1 ピコモル/ μ l) 1 μ l、5×アニーリング緩衝液 (pH 7. 5) 2 μ l を混合し、65℃で2分間加熱後、徐々に冷却することによりプライマーを鋳型
- 15 DNA にアニールさせた。次に、0. 1 M DTT 1 μ l、ラベリングミックス 2. 0 μ l、(α -³³P) デオキシアデノシン 5'-トリフォスフェート (dATP) 0. 5 μ l、8 倍希釈した Sequenase 2 μ l を加え、室温で2～5分間インキュベートした。その間、4種のジ
- 20 デオキシ NTP を含む反応停止液を 2. 5 μ l ずつ分注し、37℃でプレインキュベーションした。反応終了後、反応混合液を 3. 5 μ l ずつ各停止液の中に加え、更に

3 3

3 7 °C で 5 分間 インキュベートした。ホルムアミド色素液 4 μ l を加え、2 分間煮沸した後、ゲルへ添着した。ゲルは 6 0 c m のガラス板を用い、ゲル厚 0 . 4 m m のショ糖濃度勾配ゲルを作製した。ゲル A 溶液 4 0 m l 、

5 ゲル B 溶液 1 5 m l に対して、2 0 % N , N , N ' , N ' - テトラメチルエチレンジアミン (T E M E D) と 1 0 % アンモニウムパーサルフェート (A P S) をそれぞれ 3 2 μ l 及び 9 μ l 加えた後、ディスポーザブルの 5 0 m l シリンジを使用してゲル A 溶液、ゲル B 溶液の

10 順に吸い、気泡を 2 ~ 3 個吸入することで穏やかに攪拌し、ガラスプレートの中に注入した。残りのスペースには、上層ゲルを満たした。電気泳動は、1 \times T B E を用い、2 5 0 0 ~ 3 0 0 0 V の定電圧で 2 ~ 7 時間行なった。泳動後、ゲルを 1 0 % 酢酸 - 1 0 % メタノールに

15 1 5 分間浸漬して D N A を固定し、ゲルドライヤーで吸引しながら乾燥させ、- 8 0 °C で一晩 X 線フィルムを露光させた。

(8) 解析結果と考察

P M の各エクソン及びエクソン-イントロン接合部位

20 の塩基配列の解析を行なった結果、エクソン 9

(4 2 1 3 b p) において T C A C C C G T の 9 塩基

(4 2 1 3 ~ 4 2 2 2 b p) の繰返し配列によるインサ

ーションを確認した（図3）。

このインサーションにより3アミノ酸（バリン、プロリン、トレオニン）の挿入が考えられた。またこの位置は、薬物酸化反応において重要な鉄との結合部位であり
5 ヘム蛋白であるP450において重要な働きを担っている、ヘム結合領域（HR-2領域）の直後であった。

PMにおいては、このインサーションによる3アミノ酸の挿入が代謝活性に対してなんらかの影響を与え、代謝能が著しく低下したものと推測された。

10 CYP2D6遺伝子の上記変異は、今までに報告のない新しい型の変異であり、この変異がPMの原因と考えられた。

実施例 2

CYP2D6遺伝子新規変異の検出（PCR-RFLP）

15 （1）プライマーの設定及び精製

新規な変異の部位であるエクソン9のインサーション部位を含み、且つCYP2D6のみ特異的に増幅するように、センスプライマーを設定した。アンチセンスプライマーは実施例1で作成したもの（9-AS）と同一の
20 ものである。設定されたプライマーの塩基配列とその位置を図4に示す。

参考例2と同様にして各プライマーを精製し、これら

を用いて以下のPCR法にてエクソン9のゲノムDNAを増幅させた。

(2) PCR法によるCYP2D6遺伝子のエクソン9の増幅

5 前記参考例1で調製したゲノムDNA溶液(50 ng/ μ l) 1 μ lに、精製水17.5 μ l、5 mM dNTP溶液1 μ l、10 \times PCR溶液〔この例のみ200 mMトリスHCl (pH 8.4)、250 mM塩化カリウム、0.5%ツイーン20、1 mg/mlゼラ
10 チン、10 mM塩化マグネシウムの組成とした〕2.5 μ l、10 μ Mセンスプライマー(9-S) 1 μ l、10 μ Mアンチセンスプライマー(9-AS) 1 μ lを加えて5分間煮沸後、3分間氷冷した。これに
Taq DNAポリメラーゼ(1 U/ μ l) 1 μ lを加え
15 て全量を25 μ lとし、更にミネラルオイルを当量重層し、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を1サイクルとして、25サイクルの反応を行なった。

反応終了後、ミネラルオイルを除き、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を順次行ない、得ら
20 れた各DNA断片をTE 20 μ lに溶解させた。

増幅したDNA断片がCYP2D6由来のものであることは、バンド長(334 bp)と、制限酵素(Sty

I、A s p 7 1 8) 処理し、S t y I 処理で 2 5 7、
7 7 b p のバンドが、A s p 7 1 8 処理で 1 8 9、
1 4 5 b p のバンドがそれぞれ観察されることにより確
認された。この時、C Y P 2 D 7 が増幅すると S t y I
5 処理で 3 3 1 b p のバンドが、C Y P 2 D 8 が増幅する
と A s p 7 1 8 処理で 3 2 0 b p のバンドが観察され、
これらと明確に区別できる。

(3) P C R 産物の制限酵素処理による C Y P 2 D 6 遺
伝子のエクソン 9 のインサーションの判定

10 上記(2)で増幅した D N A 断片を制限酵素 S t y I
で処理し、そのバンド長で判定を行なった(図 5)。

即ち、(2)で調製した試料溶液 1 0 μ l に 1 0 \times H
溶液 2 μ l、S t y I (1 0 U / μ l) 2 μ l、精製水
6 μ l を加えて全量を 2 0 μ l とし、3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間イ
ンキュベートした。反応終了後、フェノール抽出、クロ
ロホルム抽出、エタノール沈殿を順に行ない、D N A 断
片を T E 5 μ l に溶かした。1 0 % アクリルアミドゲル
を用いて電気泳動を行なって、7 7 b p のバンドが観察
されると野生型と、7 7 b p 及び 8 6 b p のバンドが観
察されるとヘテロの変異型と、また 8 8 6 b p のバンド
20 が観察されるとホモの変異型とそれぞれ判定した
(図 6)。

(4) 結果と考察

P Mとその両親における、上記C Y P 2 D 6 遺伝子の新規変異の検出の結果を図7に示す。P Mとその母親

(図中M P)において86bpのバンドが認められ、本
5 発明にかかる変異(インサクション)が確認された。

P Mにおけるこの変異は母親より遺伝したことが明らかとなった。尚、図中F PはP Mの父親を示し、図にはE Mの結果も併記されている。

以上の結果より、本発明にかかるC Y P 2 D 6 遺伝子
10 の新規変異の検出はP Mの遺伝子診断に有用であることが明らかである。

産業上の利用可能性

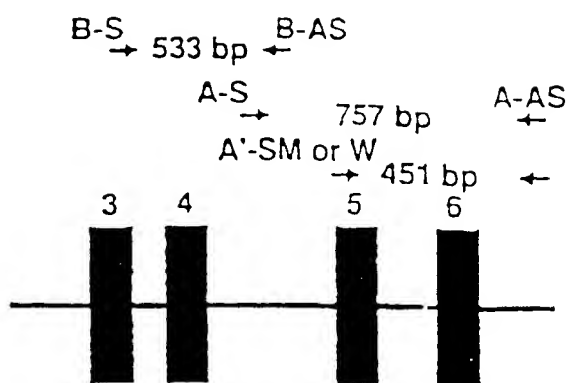
本発明によれば、C Y P 2 D 6 の遺伝子の新規な変異
が明らかにされ、かかる変異を有するC Y P 2 D 6 の新
15 規遺伝子多型の検出方法が提供される。

該C Y P 2 D 6 遺伝子多型の検出によれば、P Mの遺
伝子診断が可能であり、殊に既知のC Y P 2 D 6 遺伝子
多型に起因しないP Mの診断が可能となることで、各種
薬物による副作用発見の診断、予知、原因究明等を行な
20 う上で極めて有用である。

請 求 の 範 囲

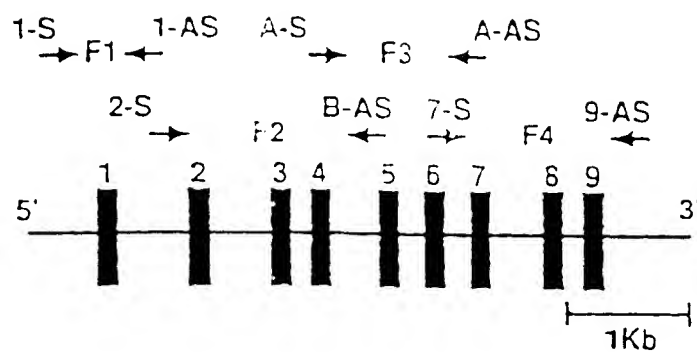
- 1 ヒトチトローム P 4 5 0 2 D 6 遺伝子のエクソン
9 において、T C A C C C G T G の 9 塩基の繰返し配
列によるインサージョンの存在を検出することを特徴
- 5 とするヒトチトローム P 4 5 0 2 D 6 遺伝子多型の
検出方法。

図 1



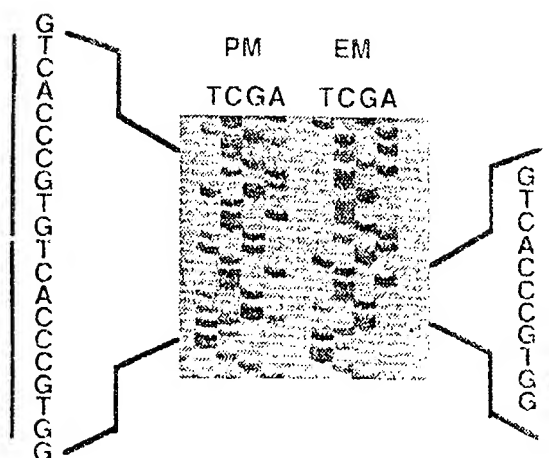
略号	配列	位置
A-S	5'- TCTGTACCTCCTATCCACGTCA - 3'	2316 - 2337
A-AS	5'- CCTCGGCCCTGCACTGTTT - 3'	3072 - 3053
A'-S-W	5'- GCTAACTGAGCACA - 3'	4525 - 4638
A'-S-M	5'- GCTAACTGAGCACG - 3'	4625 - 4538
B-S	5'- CCGCCTTCGCCAACCAC - 3'	1825 - 1843
B-AS	5'- GAAACCTAAAATCGAAATCTCTG - 3'	2358 - 2336

2



略号	配 列	位 置
1-S	5'- ACAGTCAACACAGCAGGTTCA - 3'	-85 - -66
1-AS	5'- CCACCATCCATGTTTGCTTC - 3'	339 - 320
2-S	5'- TTGCGGCGCCGCTTCGGGGA - 3'	972 - 991
7-S	5'- AAGGAGTGTCAGGGCCGGA - 3'	3183 - 3201
9-AS	5'- TCAGCCTCAACGTACCCCT - 3'	4501 - 4463

図 3



差替え用紙 (規則26)

図 4

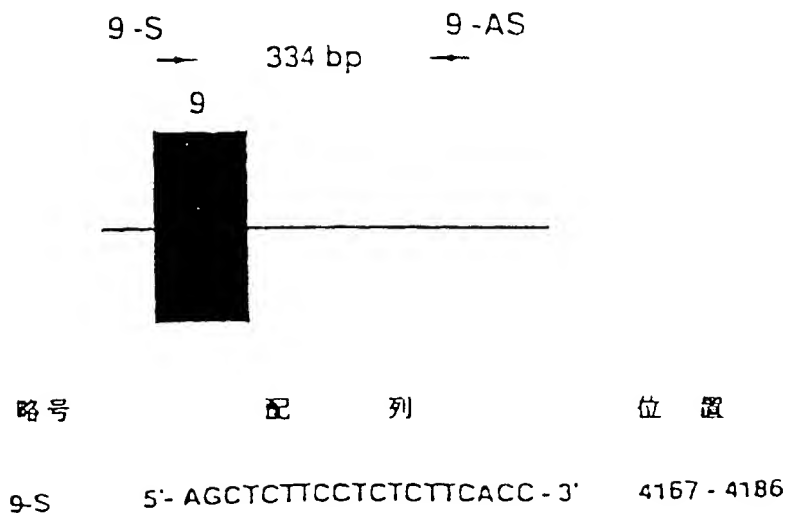


図 5

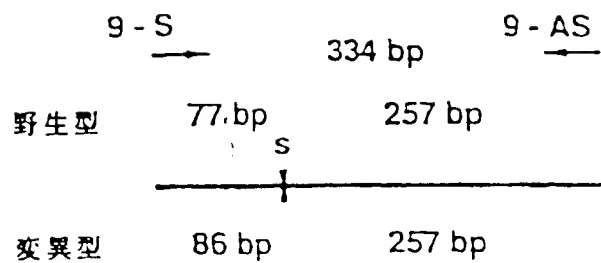


図 6

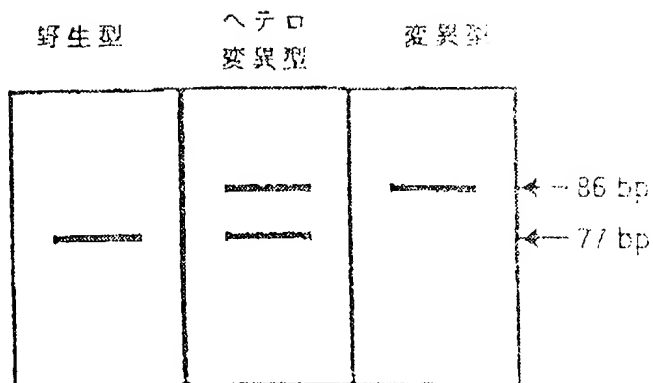
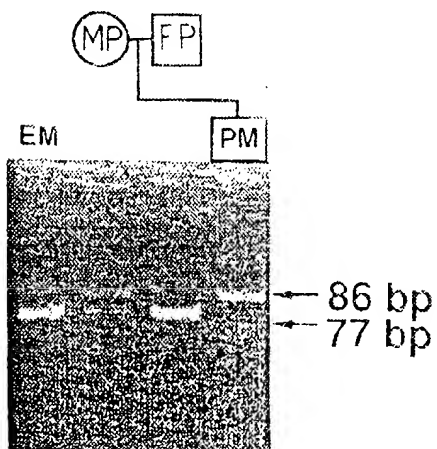


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-503845, A (Imperial Cancer Research Technology Ltd.), June 24, 1993 (24. 06. 93) & WO, 9110745, A & EP, 511262, A1 & GB, 2256271, B & AU, 642705, B	1
A	JP, 5-211895, A (F. Hoffmann - La Roche AG.), August 24, 1993 (24. 08. 93) & EP, 463395, A & CA, 2045012, A & NZ, 238610, A & AU, 645091, B	1
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, No. 24 December 15, 1993 (15. 12. 93), I. Johansson (Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine) p.11825-11829	1
A	Pharmacogenetics, Vol. 1, No. 1, 1991 (91), R. Tyndale (Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 31, 1995 (31. 07. 95)

Date of mailing of the international search report

August 22, 1995 (22. 08. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00861

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Lys-281; possible association with the poor metabolizer phenotype) p.26-32</p> <p>Pharmacogenetics, Vol. 4, No. 2, 1994 (94) M. Armstrong (The cytochrome P450 CYP2D6 allelic variant CYP2D6J and related polymorphisms in a European population) p.73-81</p>	1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 5-503845, A (インペリアル キャンサー リサーチ テクノロジー リミテッド), 24. 6月. 1993 (24. 06. 93) &WO, 9110745, A&EP, 511262, A1 &GB, 2256271, B&AU, 642705, B	1
A	JP, 5-211895, A (エフ・ホフマンローラ ロシュ アーゲ ー), 24. 8月. 1993 (24. 08. 93)	1

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 07. 95

国際調査報告の発送日

22.08.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐伯裕子

4 B 9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	&EP, 463395, A&CA, 2045012, A &NZ, 238610, A&AU, 645091, B	
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第90巻, 24号, 15. 12月. 1993(15. 12. 93), I. Johansson [Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine] p.11825-11829	1
A	Pharmacogenetics, 第1巻, 1号, 1991(91), R. Tyndale [Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281; possible association with the poor metabolizer phenotype] p.26-32	1
A	Pharmacogenetics, 第4巻, 2号, 1994(94), M. Armstrong [The cytochrome P450 CYP2D6 allelic variant CYP2D6J and related polymorphisms in a European population] p.73-81	1